

HIGH-CONCENTRATION LIPOSOME PROCESSING METHOD

Publication number: JP1501228T

Publication date: 1989-04-27

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: A61K9/00; A61K9/127; A61K9/00; A61K9/127; (IPC1-7): A61K9/10

- European: A61K9/127P

Application number: JP19870506111 19870918

Priority number(s): US19860908765 19860918; US19860909122 19860918

Also published as:

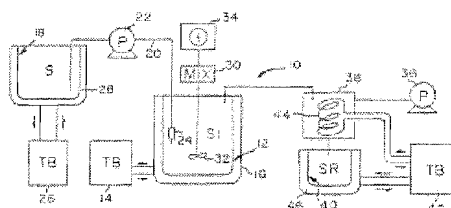
WO8801864 (A1)
EP0285638 (A1)
EP0285638 (A4)
EP0285638 (A0)

Report a data error here

Abstract not available for JP1501228T

Abstract of corresponding document: WO8801864

A method of preparing a concentrated liposome suspension having a lipid concentration of greater than about 250 $\mu\text{m}/\text{ml}$ and liposome sizes no greater than 0.4 microns. A solution of vesicle-forming lipids in a chlorofluorocarbon solvent passing from sealed feed tank (18) through feeder line (20) by pump (22) is injected through nozzle (24) into a sealed solvent infusion chamber (12) containing an aqueous medium, optionally also a water-soluble compound, and maintained at constant temperature and at a pressure of vacuum to about 200 mbar by vacuum pump (36). Extending into chamber (12) is a mixer (30) having a blade (32) and controlled by rheostat (34). Solvent drawn off by pump (36) is condensed in condenser (38) and collected in solvent-recovery tank (40). During the lipid injection and solvent-removal steps, the liposomes formed in the aqueous medium are extruded through a membrane to reduce liposome sizes to less than about 0.6 microns. The lipid injection, solvent-removal and extrusion steps are continued until a lipid concentration of at least about 150 $\mu\text{m}/\text{ml}$ is reached. The liposomes may contain reporters useful in assay (s) or drugs for administration.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

平1-501228

⑬ 公表 平成1年(1989)4月27日

⑭ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

A 61 K 9/10

3 2 7

C-7417-4C

予備審査請求 未請求

部門 (区分) 3 (2)

(全 35 頁)

⑯ 発明の名称 高濃度リボソーム処置方法

⑰ 特 願 昭62-506111

⑱ 出 願 昭62(1987)9月18日

⑲ 翻訳文提出日 昭63(1988)5月18日

⑳ 国際出願 PCT/US87/02396

㉑ 国際公開番号 WO88/01564

㉒ 国際公開日 昭63(1988)3月24日

優先権主張

㉓ 1986年9月18日 ㉔ 米国 (U S) ㉕ 908,765

㉖ 1986年9月18日 ㉔ 米国 (U S) ㉕ 908,122

⑳ 発 明 者

マーチン, フランシス ジェ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94127 サン フランシスコ,

イ,

ウエスト ボーダル アヴェニュー 415

㉑ 発 明 者

ウエスト Ⅱ, グレン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070 サン カルロス, コロ

ネド アヴェニュー 36

㉒ 出 願 人

リボソーム テクノロジー, イ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025 メンロ パーク, ハミ

ンコーポレイテッド

ルトン コート 1059

㉓ 代 理 人

弁理士 山本 秀策

㉔ 指 定 国

A T (広域特許), A U, B E (広域特許), C H (広域特許), D E (広域特許), F R (広域特許), G B (広域特許), I T (広域特許), J P, L U (広域特許), N L (広域特許), S E (広域特許)

請求の範囲

1. 脂質濃度が約 250 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ より高くかつリボソームのサイズが約 0.8 ミクロンを越えないリボソーム懸濁液を調製する方法であって、該方法は、

小胞形成性脂質をクロロフルオロカーボン溶媒に溶解させ、溶液中脂質溶液を形成すること、

該脂質溶液を液体の状態で、脂質の発泡が大きく避けられるような圧力および温度条件下で、そして主としてオリゴヌクレオチドを生じるような注入速度で、水性媒体中に注入すること、

該注入工程の際に、注入されたクロロフルオロカーボン溶媒を、それが水性媒体中に導入されると実質的に同じ速度で、該媒体から除去すること、

また、該注入工程の際に、該水性媒体中に形成されたリボソームを抽出し、最大のリボソームのサイズを約 0.6 ミクロンを下まわるように減少させること、および

該水性媒体中の脂質濃度が少なくとも約 250 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ となるまで、該注入、除去および抽出を継続すること、を包含する。

2. 前記脂質が「フロン11」に約100 ~ 700 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の濃度で溶解する請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 前記脂質溶液がまた、「フロン23」を包含する請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 前記脂質溶液の脂質濃度が約 250 ~ 700 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ であ

り、そして前記リボソームが、永性媒体 100 ml につき 1 分あたり脂質溶液として約 0.5 ~ 2 ml の注入速度で該永性媒体に注入される請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 前記リボソームが、0.1 ~ 0.4 ミクロンの選択された孔サイズのポリカーボネート膜を通して押し出される請求の範囲第1項に記載の方法。

6. 前記リボソームが約 1 ミクロンの孔サイズを有する非対称性セラミックフィルターを通して押出される請求の範囲第1項に記載の方法。

7. 捕捉された親油性化合物を含有するリボソームを調製するのに用いられる請求の範囲第1項に記載の方法であって前記化合物は脂質溶液中に溶解している。

8. 水およびクロロフルオロカーボンの両者に可溶な脂質をさらに含むクロロフルオロカーボン溶媒に可溶な水溶性化合物を含む、リボソームを調製するのに用いられる請求の範囲第1項に記載の方法であって、該化合物は該脂質溶液中に最初から溶解している。

9. 前記化合物がプロプラノールであり、前記クロロフルオロカーボン溶媒が、該化合物を該溶媒中に溶解するのに必要とされる容量のエタノールを含有する請求の範囲第8項に記載の方法。

10. 主として約 0.1 ミクロンを下まわるとサイズのリボソームを含有しないリボソームを形成するのに用いられる請求の範囲第1項に記載の方法であって、前記懸濁液は脂質溶液が

特表平1-501228(2)

よび水性媒体が連続的に供給される反応器中で形成され、そして該方法はさらに、前記注入工程の際に該懸濁液を遠心分離し、主として約 0.1ミクロンを下まわるサイズのリボソームを含む濾液および主として約 0.1ミクロンを上まわるサイズのリボソームを含む遠心残渣を形成すること、および該懸濁液を濾液中に注入すること、を包含する。

14. 主としてリボソームにカプセル化された形態の水溶性化合物を含むリボソームの懸濁液を調製する方法であって、該方法は、

小胞形成性脂質をクロロフルオロカーボン溶液中に溶解させ、溶液中脂質溶液を形成すること、

該脂質溶液を液体で、脂質の発泡が大きく避けられるような圧力条件下で、そして主としてオリゴマー小胞を生じるような注入速度で、該溶液の沸点を超える温度に維持され、カプセル化されるべき化合物が該溶液または該溶液に溶解している水性媒体中に注入すること、

該注入工程の際に、注入されたクロロフルオロカーボン溶液を、それが水性媒体中に導入されると実質的に同じ速度で、該媒体から除去すること、および

該水性媒体中の脂質濃度が約150 ~ 400 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ となるまで該注入を継続すること、

を包含する。

12. 前記注入を、前記懸濁液中の脂質濃度が約 250 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ あるいはそれ以上となり、そしてカプセル化効率が少なく

とも約80%となったときに終了させる請求の範囲第11項に記載の方法。

13. 主として約 0.6ミクロンを下まわるサイズを有するリボソームの懸濁液を製造するのに用いられる請求の範囲第11項に記載の方法であって、該方法はさらに前記注入工程の際にリボソームを抽出することを包含する。

14. 主として約 0.1ミクロンを下まわるサイズのリボソームを含有しないリボソームを形成するのに用いられる請求の範囲第11項に記載の方法であって、前記懸濁液が脂質溶液および水性媒体が連続的に供給される反応器中で形成され、そして該方法はさらに、前記注入工程の際に該懸濁液を遠心分離し、主として約 0.1ミクロンを下まわるサイズのリボソームを含む濾液および主として約 0.1ミクロンを上まわるサイズのリボソームを含む遠心残渣を形成すること、および該脂質溶液を濾液中に注入すること、を包含する。

15. リボソームペーストを形成するのに用いられる請求の範囲第11項に記載の方法であって、該方法はさらに前記懸濁液を限外濾過によって濃縮することを包含する。

16. 前記小胞形成性脂質が少なくとも約90モル%の荷電脂質を含有し、そして前記注入が、前記水性媒体中の脂質濃度が約 150 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ に達したときに、リボソームサイズを約1.5ミクロンを下まわるように減少させるのに有効である、請求の範囲第11項に記載の方法。

17. 前記荷電脂質がホスファチジルグリセロールである請

明 細 書

高濃度リボソーム製造方法

1. 発明の分野

本発明は、高カプセル化効率および高脂質濃度により特徴づけられるリボソーム懸濁液を調製するための方法に関する。

2. 従来の技術

- Cafiso, D.S., *Biochim Biophys Acta* 649:129(1981).
 Deamer, D., Jr., *Biochim Biophys Acta* 443:629(1976).
 Galison, A., Jr., *Cancer Research* 42:4734(1982).
 Poznansky, M.L., Jr., *Phara Res* 36(4):277(1984).
 Schieren, H., Jr., *Biochim Biophys Acta* 542:137(1979).
 Szoka, F., Jr., Jr., *Proc Nat Acad Sci (USA)* 75:4194(1978).
 Szoka, F., Jr., Jr., *Ann Rev Biophys Bioeng* 9:467(1980).

3. 発明の背景

リボソームは薬物供給においていくつかの利点を提供する。非経口的投与されたとき、静脈内もしくは筋肉内の経脈のいずれであっても、血液における遊離の薬物の濃度を制限することにより、リボソームは、長時間にわたりカプセル化された薬物の制御された“貯蔵的な”放出を提供し、該薬物の副作用を減じることができる。リボソームは治療学的に好適な方法において、薬物の組織分布ならびに取り込みを変化

特表平1-501228 (3)

させることができ、そして、薬物投与の頻度を低くすることにより、法律を便利にすることができる。リボソーム薬物供給システムはPoznanickyにより特許が出されている。

吸入法による薬物供給のためのリボソームの使用もまた研究されてきている。そしてそれは同出願人による米国特許出願、「リボソーム吸入およびその方法、出願番号第737,221号(1985年5月22日出願)に報告されている。吸入リボソームは、脂質組成により、捕捉された薬物が選択された放出速度で放出するように、調整され得る。その放出速度は、半減期が数時間から数日の間で変化しうる。さらに、薬物がリボソーム内に隔離されている限り、呼吸管および血流中に急速に取り込まれることによる副作用が減じられる。

リボソームと、親油性および親水性の薬物の両者の適合性、および選択された薬物の放出速度を達成するための脂質組成を最適化する能力はまた、薬物を局所的に投与することもしくは精製組織へ投与することに対してまた有利である。精製組織へ薬物供給するためのリボソームの付加的な利点は、亜的組織部位でのリボソームの存在時間を長くするために、膜リボソーム表面が組織への粘着性を防止させるために改変され得ることである。この現象は同出願人による特許出願である「精製組織でのリボソームの保持の促進」出願番号第990,615号(1986年7月22日出願)に記載されている。

薬物を捕捉したりリボソームを構築するためのいくつかの方法が知られている。ある方法においては、小胞形成性脂質を、

ガラスの側面に薄いフィルムとして沈着させ、そして、水相緩衝液を加えることによりゆっくりと再水和させる。捕捉されるべき薬物は脂質層(親油性薬物の場合)に、もしくは水和媒体(親水性薬物の場合)のいずれかに包含され得る。生成するリボソームは、約0.5から10ミクロンの間の不均一なサイズの多量子メラ小胞(MLV)である。

このMLVは、典型的には、ホモジナイズ(均質化)、超音波処理または膜を用いた押出しにより均質化して処理され、より小さく、より均一化したサイズの懸濁液が生産される。約0.2から0.4ミクロンまでにサイズを小さくしたリボソームが一般に好適である。このサイズの領域のリボソームは、0.45ミクロンのフィルターを通過させることにより濃縮され得る。そして、このようなリボソームは凝集する傾向が少なく、かつ静脈内投与を行ったときに臓器へのより好ましい分布を示し得る(Gabizon)。

MLV法の欠点の1つは、水溶性の薬物のカプセル化効率に比較的低いことである。典型的には、小胞が水性薬物増強を添加することにより開裂された場合には、脂質フィルムに添加された全薬物のうち約5〜15%のみが小胞にカプセル化される。必要に応じてリボソームのサイズ調整を行うことにより、さらに造粒の薬物の割合(%)が低くなる。なぜならリボソームのサイズ調整量により、一般にカプセル化された物質のある程度の損失が生じるためである。

より高いカプセル化効率でリボソームを製造する別の方法

が報告されている。これらのうちの1つは溶媒注入である。この方法においては、希液中脂質溶液(lipid-in-solvent solution)が水性媒体中に注入される(Beaner, Schieren, Celisio)。この方法により、カプセル化効率(捕捉容量)が約20〜45%で比較的均一な、単ラメラ小胞が生産される。捕捉容量がより高いのは、おそらく比較的大きな単ラメラの構造の形成に因ると思われる。

カプセル化効率の向上はまた、逆蒸発法(reverse evaporation method)によるリボソームの凝集によって達成される(Szoka, 1978, 1980)。ここでは脂質中脂質溶液が水性媒体と混合され、そして乳化されて油中水型乳濁液が形成される。脂質濃度を高くすることにより逆蒸の脂質ゲルが生じる。次にそれを、好ましくは水性媒体を添加し、該水性媒体の存在下で攪拌し、逆蒸発小胞(reverse-phase evaporation vesicles: REV)が形成される。このREVは、比較的大きなサイズと、1から数層の二重層となる数により特徴づけられる。水溶性化合物のカプセル化効率は、典型的には、最初の水性媒体中に存在していた化合物の約30〜50%の間である。

溶媒注入とREV法の両者において、蒸発によるリボソームの凝集を可能とするために、および/またはリボソームの機能的適合性を改善するために、リボソームのサイズを減少させることは必要であろう。REVの場合においては、リボソームのサイズ調整を行うとカプセル化された物質の損失が生じる。

リボソームによる薬物供給の利点はリボソームによる薬物

の捕捉に依存するので、主としてリボソームに捕捉された形態の薬物(つまり、少なくとも薬物の約50%がリボソームに捕捉されたもの)として投与することが、一般に望ましい。これは、特に、薬物が凝集の形で投与されたときに益されない副作用を引き起こすことが知られている場合においては、そのとおりである。水溶性の薬物を主としてリボソームの形で投与することの利点は同出願人による特許出願「リボソーム吸入法およびシステム」出願番号第737,221号(1985年5月22日出願)に記載されている。ここには、核酸メタプロセラノール(mPS)が主としてリボソームにカプセル化された形で吸入されるときには該薬物の全体的な副作用が大きく減じられることが示されている。

水溶性薬物の場合には、既知のリボソーム凝集法においては最高で30〜50%のカプセル化が達成されているが、後リボソームに遊離の薬物を除去する処理を行うことによりより高いカプセル化レベル(カプセル化薬物が50%を超える)が達成され得る。これは、一般に、分子篩クロマトグラフィー、遠心分離もしくは透析濾過(diafiltration)によりなされる。これらの方法のすべてにおいて、遊離の薬物を含むバルク相(bulk phase)の懸濁液は、薬物を含まないバルク媒体(bulk medium)によって置換される。

このアプローチの欠点は、遊離の薬物を除去するために付加的な工程、および必要に応じて除去された薬物の再利用が必要であることである。水溶性で、リボソーム透過性の薬物の捕

特表平1-501228(4)

合における第2の制限事項は、懸濁液中において、カプセル化された部分とバルク相の部分間で薬剤が再平衡化し得ないうちにリボソーム組成物を投与しなければならぬことである。この第2の問題点は岡田健人の特許出願「リボソーム濃縮物および方法」出願番号第960,328号(1996年3月5日出願)に述べられている。この発明によれば、水溶性でリボソーム透過性の薬剤を含むリボソームの希釈懸濁液は、脂質ペーストにまで濃縮される。この脂質ペーストには、水性物質が少なくとも約50容量％、好ましくは約70容量％カプセル化されて含有される。上記割合はまた、リボソームにカプセル化された薬剤の割合(％)を示す。この懸濁液は凍結された形で保存され、そして、使用直前に希釈される。つまり、希釈された懸濁液中の薬剤は非平衡状態で、主としてカプセル化された形態で投与される。遊離の薬剤の除去およびリボソームの濃縮は超遠心分離、遠心分離などにより一工程で行われ得る。その有用性にもかかわらず、リボソームペーストを用いたアプローチは、複雑な薬剤の損失およびリボソーム懸濁液を付加的処理する工程を包含する。

4. 発明の要約

本発明の一般的な目的は、従来技術の上記問題点およびリボソーム調製法の制限を大きく克服するリボソーム処理方法を提供することにある。

より詳細には、本発明の目的は、水溶性化合物のカプセル

化効率が少なくとも約50％、そして、70％もしくはそれ以上までとなるようなリボソームの濃縮液を提供することにある。

本発明の他の目的は、付加的な脱水処理を行わずにペーストもしくは、ペーストに近い形態で存在する濃縮されたリボソーム懸濁液を調製する方法を提供することにある。

それに関連した目的は、凍結凝固により容易に凝固され得るそのようなペーストを解凍する方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、50％を超えるカプセル化を保持しながら、例えば、0.1~0.4ミクロンという狭いサイズ領域のリボソームを製造するのに適宜し得るリボソーム処理法を提供することにある。

本発明は、ある局面においては、主として水溶性化合物を含む(つまり、リボソームにカプセル化された形態で50％を超える割合で含有する)リボソームの懸濁液を調製する方法を包含する。本法を実施する場合には、クロロフルオロカーボン溶液を用いた小胞形成性脂質の溶液が、脂質の発泡が大きく避けられるような圧力、温度および攪拌条件下で、そして主としてオリゴヌクレオチドを主とするような注入速度で、水性媒体中に液体状態で注入される。カプセル化されるべき化合物は水性媒体または脂質相のいずれかに溶解させる。溶液の注入は、水性媒体中の脂質濃度が約150~500 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ となるまで続けられる。注入された溶液は注入されたゆえ実質的に同じ速度で除去され、そして、回収された脂質濃度に達したときに完全に除去される。

最終リボソーム濃度が少なくとも約250 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ になるまで溶液の注入を続けると、約60~70％の捕獲効率が達成される。高濃度の懸濁液はリボソームペースト(例えば、薬剤含有リボソームの脂質形態である)として使用するのに適している。この高濃度の懸濁液は、水をさらに除去することにより簡単にペーストに濃縮され得る。もしくは薬剤を含有しない緩衝液で所望のリボソーム濃度にまで希釈され得る。

他の局面においては、本発明は、脂質濃度が約200 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 程度を越え、そしてリボソームのサイズが約0.6ミクロンを越えないリボソームを含む濃縮されたリボソーム懸濁液を調製する方法を包含する。この方法においては、クロロフルオロカーボン溶液を用いた小胞形成性脂質の溶液を上記のように、脂質の発泡が大きく避けられるような圧力、温度、攪拌条件下で、そして、主としてオリゴヌクレオチドが主となるような注入速度で、水性媒体中に注入される。カプセル化されるべき化合物は水性媒体もしくはクロロフルオロカーボン溶液に溶解させる。注入工程の間に、この水性懸濁液は、リボソームを0.1~0.6ミクロンの間のサイズに調整するのに有効な超音波により循環させる。溶液の注入、および引き続いて行われる抽出および回収の除去は、最終的に所望のリボソーム濃度(それは100~500 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ と高濃度であり得る)およびリボソームサイズの範囲となるまで続けられる。濃縮された物質は、0.45もしくは0.22ミクロンのフィルターを過すことにより凝固され得る。

この2つの方法を組み合わせると、濃縮されたリボソーム懸濁液を製造するのに有効である。このリボソーム懸濁液は、a)リボソームサイズが約0.4ミクロンを下まわり、そして、b)水溶性薬剤を主としてカプセル化された形態で有する。

さらに他の局面においては、リボソーム懸濁液は、凍結溶入およびサイズ調整の工程の間に凍結され、選択されたサイズ範囲を下まわるリボソームが除去される。そして、これらのリボソームは再循環され、新たに注入された溶液中脂質濃度と混合される。この間に小さいリボソームの部分はより大きなものへと変換される。連続的な凍結、再循環、および注入混合により、最終的にリボソーム懸濁液が本発明の他の利点(例えば高カプセル化効率および高脂質濃度)を犠牲にすることなく調製され、そしてこれはより小さなリボソームを実質的に含有しない。

本発明のこれらのそして他の目的と特徴とは、次の本発明の詳細な説明を添付の図面とあわせて読むことにより、より充分に明らかとなるであろう。

図面の簡単な説明

第1図は本発明を実施するのに用いた脂質処理システムをダイヤグラムの形で示す。

第2図はリボソーム調製において抽出しによりリボソームのサイズを調整するために用いる。第1図のシステムにおける付加的な構成部分を示す。

第3図は所定の範囲のサイズを有するリボソームの調製に用いるためのリボソーム処理システムの他の実施態様の一部を示し、

第4図は本発明に従って実施された2つの異なる処理方法における脂質濃度の間接としてのカプセル化効率のプロットを示し、そして第5A～第5D図は、脂質濃度50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ (4A)、100 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ (4B)、150 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ (4C)、および200 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ (4D)においてリボソームの調整方法を実施したときに撮影したリボソームの顕微鏡写真を示す。

発明の詳細な説明

1. 高度カプセル化処理

A. 処理システム

第1図は、本発明の方法により高カプセル化効率でリボソームを調製するのに用いられる処理システムを示し、これは、10で示される。このシステムは、密封された溶媒注入槽12を有し、この注入槽は操作中にリボソームが形成される水性媒体の所定量を含有する。この槽の総容量は、小容量処理のための100 ml もしくはそれ以下の容量から、リボソームをスケールアップして生産するための100 L もしくはそれ以上の容量の範囲であり得る。ここに述べる特定のシステムは、単一の槽において約4 L までのリボソーム懸濁液を調製するために設計され、そして、溶媒注入槽は約5 L の総容量を有する。全体のシステムは、より大きな槽の容量を適合さ

装置34により制御される。好ましくは1分あたり約400および1500回転の間のブレードの回転を生じさせるように操作される。

容器中の圧力は、操作中、真空ポンプ35により約200 ミリバールの真空度に維持させる。このポンプは、図示されるように、冷却器38により槽に連結される。この冷却器においては、ポンプにより除去された溶媒が凝結する。凝結した溶媒は溶媒回収タンク40に集められる。温度制御槽42は、冷却水のような冷却媒体を、冷却器の中の凝結コイル44およびタンク40を取り囲む水冷ジャケット46に供給する。

B. 処理成分

溶媒中脂質溶液は、クロロフルオロカーボン溶媒に溶解させた小胞形成性脂質を含む。このクロロフルオロカーボン溶媒の沸点は、好ましくは室温を下まわり、さらに好ましくは約2～10℃の範囲である。ここで定義されている「クロロフルオロカーボン」とは、窒素化、フッ素化された炭素もしくは炭化水素であり、上記沸点の特徴を持ち、そして脂質溶液として用いられ得るものである。典型的なクロロフルオロカーボンには、「フロン11」(CCl_2F)、「フロン12」(CCl_2F_2)、「フロン21」(CHClF_2)、「フロン22」(CHClF_2)、「フロン113」($\text{CCl}_2\text{FCClF}_2$)、「フロン114」($\text{CClF}_2\text{CClF}_2$)、および「フロン115」(CClF_2CF_3)が含まれる。好ましい溶媒は、トリクロロフルオロメタン(「フロン11」)であり、その沸点は1気圧で23.8℃である。または、トリクロ

特許平1-501228 (5)

するため、スケールアップもしくはスケールダウンされ得ることは理解されるであろう。

槽12は、槽壁を取り囲むジャケット15を介して温度調節槽14(これは、所望の温度の水もしくは他の適当な冷媒を循環させる)により、操作中所定の温度に保持される。この槽は、槽内の液体の内容物の温度を脂質溶媒の沸点を越える温度、典型的には約5℃から45℃の間の選択された温度に保持するように操作可能である。

溶媒中脂質溶液は、槽に連結した密閉溶媒供給タンク18から供給ライン20およびインライン供給ポンプ22を介して槽槽に注入される。溶媒物質は、好ましくは水性媒体の表面直下に位置するノズル24を介して槽内に導入される。ポンプ22は、混合槽内の水性媒体100 ml につき1分あたり約0.5～2 ml 、好ましくは約1 ml の割合で溶媒溶液を注入するように操作される。つまり、もし混合槽が270 ml の水性懸濁液を含むならば、このポンプは、1分あたり約1.4から3.4 ml 、好ましくは約2.7 ml の溶媒を注入するように操作される。

タンクおよび供給ラインの循環は、操作中、温度調節槽26により該溶媒の沸点を下まわる選択された温度に維持される。この温度槽は、冷却水のような冷却された流体を、供給タンクを取り囲むジャケット28および供給ラインを取り囲むジャケット28のスリーブ(図示しない)内に循環させる。

槽中に延びるブレード32を含む混合機30は、操作中に槽中の液体を混合するのに用いられる。このブレードの速度は加

ロフルオロメタンとジクロロフルオロメタン(「フロン21」)との混合物であり、その沸点は1気圧で8.9℃である。カプセル化されるべき化合物が懸濁液を形成するのに使用される水性媒体に含有され得ず、かつ純粋なクロロフルオロカーボン溶媒に容易に溶解しない場合には、溶媒は、クロロフルオロカーボンおよび水の両方に混合し得るエタノールのような溶媒を約10～20% (v/v) まで含有し得る。溶媒注入の選択された条件下で反応性であるか、もしくは、水性リボソームの懸濁液中で低濃度であれば評価される他の少量の有機溶媒もまた含有され得る。

小胞形成性脂質は、リン脂質およびステロールを一般に包含する既知の小胞形成性脂質の中から選択される。リボソームの調製に通常用いられるリン脂質のリストは、Szoka, 1980の471頁に記載されている。即ホスファチジルコリン(卵PC)、卵PC/コレステロール混合物のような天然の脂質成分が適当であり得る。しかし、本発明により行われる実験においては、ホスファチジルグリセロール(PG)のような荷電した脂質が約5～10%存在すると、リボソームの形成工程においてより小さく、より均一なサイズのリボソームが形成することが示された。実施例「および」に記載された好適な脂質組成は、55モル%の卵PC、5モル%のPG、および40モル%のコレステロールを含有する。

さらに、脂質溶液は、α-トコフェロールのような脂溶性保液剤および/またはリボソームの脂質二重層中に閉鎖され

特表平1-501228 (6)

るべき親油性の薬物化合物を含有し得る。リボソーム中に捕捉された形で投与され得る代数的な親油性化合物としては、プロスタグランジン、アンファテリシンB、プロゲステロン、硝酸イソソルビド、チロステロン、ミトログリセリン、エストラジオール、コルチゾン、デキサメタゾンおよび関連するエステル、および高濃度ベタメゾンが包含される。上記のように、リボソームを形成するのに使用される水性媒体にこれらを含有させることができないような場合には、脂質溶液はカプセル化される水溶性化合物を含有し得る。ひとつの例として、本発明により行なわれ、以下に説明される調査により、溶解注入法に用いられる水性媒体中に水溶性化合物であるプロプラノロールをはじめから溶解させた場合には、リボソームの破壊を引き起こすことが示される。しかし、脂質溶液（フレオン11：エタノール、10：1）に溶解させると、非常に高い割合でプロプラノロールがカプセル化されたリボソームが形成される。

溶液中の脂質濃度や貯留濃度は、選択された溶液容量を導入した後の水性媒体中における望ましい脂質濃度を達成するように調整される。前述のように、最終的なリボソーム懸濁液中の脂質の最小濃度は約150 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ であり、そして水性媒体中に加えられる脂質溶液の総容量は混合槽の水性媒体の総容量の約1/2から2倍である。望ましくは、脂質濃度は約200～700 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の間で調整される。ここでは、「フレオン11」と「フレオン21」との等容混合物のような混合

クロロフルオロカーボン液体が、高濃度脂質溶液に用いるのに好適であり得ることが示されている。従って、溶液中の脂質濃度は、所望量の脂質がこの混合容量範囲内となるように水性媒体中に加えられることにより調整される。

上記水性媒体は、典型的にはpHが約6.0および7.5の間の緩衝性のある水溶液であり、そして通常、リボソーム内へカプセル化されるべき水溶性の薬剤または化合物を含む。この薬剤は、水性媒体に比較的可溶であり、リボソームが非経口的に、局所的に、吸入によりまたは他のルートにより投与されたときに、制御された速度でリボソームから放出され得るあらゆる薬物、ホルモン、ペプチド、ビタミン、あるいは他の医薬物試薬であり得る。制御された放出は、リボソーム透過性の薬物の場合にはリボソーム膜を通しての薬物の通過により、あるいは、リボソーム非透過性の薬物の場合にはリボソームの破壊により起こり得る。代表的な水溶性薬物には、テルブタリン、アルブテロール、アトロピンメチル、クロモリンナトリウム、プロプラノロール、フルメチソリド、イブuprofen、ゲンタマイシン、トベロマイシン、ペンタアミジン、ペニシリン、チオファイリン、ブレオマイシン、エトキシド、カプトプリル、 α -アセチルサリチン、ペランピニル、フルオロウラシル、コードウリジン、トリフルオロウリジン、ビダラビン、アジドチミジン、リバビリン、ホスホノフェルメート、ホスホノアセチート、アシクロビル、セメチジン、ナファゾリン、ロドキシミドおよびフェニルエタノール。

イリンが包含され、リボソーム二重膜を通して拡散し得る比較的小さい化合物の例である。水溶性でリボソーム非透過性の適当な化合物としては、ペプチドホルモン、酵素、酵素阻害剤、アポリポタンパク、および高分子量炭水化合物が包含される。このクラスの代表的な化合物には、カルシトニン、アトリオペプチン、 α -1-アンチトリプシン、インターフェロン、オキシトシン、パンプレックス、インシュリン、インターロイキン2、スーパーオキシドジスムターゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、血漿第8因子、免疫細胞成長因子、腫瘍壊死因子、腫瘍免疫活性タンパク、およびリゾコレステロールが包含される。水性媒体中の薬物濃度は、リボソーム中にカプセル化される体積であることが好ましい。

さらに水性媒体には、貯蔵中に起こり得る脂質の酸化防止加水分解、あるいは薬剤の分解を防止するキレート剤のような可溶性保護剤が含有され得る。

(以下空白)

C. 処理過程

この態は、水溶性化合物のカプセル化効率が約50%以上、および65%またはそれ以上の高効率であるリボソーム製造に用いられる方法を記述する。操作は、上述のIAおよびIBの節で詳述した処理システムおよび成分に関して記述する。初めに、脂質を供給タンク18に加え、そして水性媒体を槽12に加える。そして、選択された圧力における脂質溶液の沸点以上および以下である槽およびタンクの温度に、この2つの溶液をそれぞれ温度調節器14、24により平衡化する。好ましくは、「フレオン11」中に脂質溶液がある場合には、脂質溶液および水性媒体を操作の間それぞれ約4℃および20℃に平衡化し、維持する。

混合槽を1分間あたり約850回転の周の好ましい速度で操作し、混合槽内の真空度を200から400mbarの間に設定し、混合槽内に入れてある水性媒体へ冷却した脂質溶液を供給するようにポンプ22を作動する。上述したように、脂質表面の少し下、好ましくは脂質表面下約1から3cmの間に溶液を注入する。そして、100ml水性媒体あたり1分間に約1mlの好ましい速度で溶液を槽に供給する。もし注入速度が非常に低い場合には、脂質小胞はより多量なラメラの構造をとる傾向があり、多量なラメラ構造は単位脂質あたりのカプセル化量を減少させる傾向がある。もし注入速度が非常に高い場合には、脂質材料は泡になる傾向があり、脂質材料の損失があり、カプセル化が十分に行われず、戻りは溶液蒸気の槽からの静

虫が速すぎることもよっても引き起こされ得る。それゆえ、もし起泡が観察された場合および溶液の注入速度が上述した速度よりも早くない場合には、起泡が十分に除去されるまでシステム内の真空度を減少すべきである。

上述した処理条件下では、形成されたリボソームは、大部分がオリゴメラである。すなわち、このリボソームは常に1つまたはほんのわずかの二重鎖を含有する。方法の初期段階では、リボソームは異なるサイズで分散されており、諸サイズはミクロンを下回るサイズから10ミクロンまたはそれ以上の範囲である。第5A図は、混合槽内の総脂質濃度が50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ に達したときに形成されるリボソームの典型的な顕微鏡視野を示す。図中に見られるより大きなリボソームは約10~15ミクロンの間であり、より小さいリボソームは1.5ミクロンまたはそれよりも小さい。カプセル化された水溶性物質のパーセントの決定は、実施例1に記載した方法に従うと、50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の製品中の総封入量は約30~35%の間であることを示す（実施例1）。

本発明の脂質な見地に従い水性懸濁液への脂質の添加を続けると、300 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ またはそれより高い脂質濃度でカプセル化された水溶性マーカー（封入量）のパーセントは、最大約60~65パーセントの間のカプセル化に達するまで連続的に増加する。カプセル化効率の一時的上昇は、脂質濃度の間歇として第3図に見られる。図中の上方のカーブ（黒丸）は、実施例1で記述した処理の実施の1つからプロットしたもので

特表平1-501228 (7)

ある。グラフ中の破線は、50パーセントカプセル化効率に達したときの脂質濃度を示す。カプセル化された化合物はフルオレセインであり、フルオレセインは比較的小さい水溶性の化合物の典型であり、リボソーム懸濁液をつくるときに使用される水性の緩衝液に最初から含有される。

小胞を形成する脂質がPCのように荷電した脂質成分を含有する場合、溶液中脂質の混合層への連続的な添加は、懸濁液中のより大きなリボソームのサイズを徐々に減少させる。この効果は第5B図~第5D図に見られ、これらの図はそれぞれ100、150、および200 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ のリボソーム懸濁液の一時的な様相を示す。100 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の脂質濃度では50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の懸濁液に関して一般的にサイズの減少が容易に認められ、150 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の脂質濃度ではほとんどすべてのリボソームは約1.5ミクロンまたはそれよりも小さい。さらに脂質を漸加させて200 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ にすると、リボソームのサイズ分布に有意な変化はない。このように、高いカプセル化効率に加えて、本発明の方法は、約1.5ミクロンよりも小さな最大のリボソームサイズの比較的平均なサイズ分布のリボソームを提供する。

(以下省略)

この方法で見られるリボソームサイズのゆるやかな減少は、荷電した脂質成分の存在は、実施例1の場合には、5 $\mu\text{mol}\%$ ホスファチジルグリセロール(PC)の存在に関連していることを示している。以下の実施例IIおよびIVでは、荷電していない脂質、すなわちPCのみ、あるいはPCとコレステロールとを含有した溶液非融合法について述べられている。両方の実施例では、最終的なリボソームサイズは不均一であり約0.1ミクロンと10ミクロンとの間である。

リボソーム懸濁液は、脂質濃度が約300~400 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ より大きくなると極めて粘稠になる。そして、さらに脂質を導入することは困難であり、不可能となる。濃縮された懸濁液はペースト状の粘稠性を有しており、以下の実施例で考察されるように、リボソームペースト剤を利用するいくつかの応用例に適している。あるいは、出願人が共有している米国特許出願「リボソーム濃縮および方法」、第860,528号（1996年5月7日公開）に記載されている方法に従って、このペースト状物質をさらに脱水和し、カプセル化効率を約70%またはそれ以上に増加させる。

この製法は、無菌の脂質および水溶性成分を用い、また脂質成分と接触するシステム内の容器や送液管を予め殺菌しておくことにより無菌状態で実施し得る。あるいは、これらのリボソームは、治療前に滅菌液面し得る。ここでは、これらのリボソームは最大サイズが約0.4ミクロンになるようにさらにサイズを小さくしなければならぬ。好ましい

サイズ調整方法では、リボソームを限定した孔サイズを有する膜に通して押し出す。このような膜には、例えば0.4ミクロンの孔サイズを有するポリカーボネート膜(Soka, 1982)、または非対称なラミナ膜などがある。これらの方法については、出願人が共有している米国特許出願「リボソーム押出し法」、第829,710号（1996年2月28日公開）に記載されており、また以下でも考察されている。

実施例IIでは、100~350 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の間の多くの脂質濃度のうちの1つを有するリボソーム懸濁液に適用されるような、ポリカーボネート膜による押出し法について述べられている。該実施例における表2には、押出した後のいくつかの脂質物の割合について測定したカプセル化効率を示されている。表3（実施例1）におけるカプセル化データと、このデータとを比較すると、カプセル化された物質は押出し工程により失われている。これは、おそらく押出し中に大きな小胞が破壊され、より小さな小胞を形成するためである。最大脂質濃度が約350 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の場合に、この方法で達成し得る最高のカプセル化率は約65%である。従って、リボソーム濃縮法とそれに続く押出しとの組合せは、リボソーム濃度が約350 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ に限定され、カプセル化効率が50%より低く限定される。これらの制限は以下に記載される高濃度法により解除される。

実施例IIIでは、カルシウムを高い効率でカプセル化したリボソームの製造方法の有用性について述べられている。カルシウムは、もともと水性媒体に含まれる水溶性のリボ

ソーム導透性化合物の代表例である。カルシウム含有リボソームは、「フレオン11」に溶解した脂質懸濁液の溶液を、カルシウムの水溶液に、最終脂質濃度が約 $300 \mu\text{mol}/\text{ml}$ になるまで注入することにより調製した。実験例で述べられているように、この方法によるカプセル化効率は60%を越えた。非脂質成分を使用したので、上で考察したように、最終的なリボソームサイズは約10ミクロンまでの範囲内であった。

実施例IVでは、プロプラノロールをカプセル化したリボソームを調製する方法の有用性について述べられている。プロプラノロールは、もともとは脂質溶液に含まれる水溶性化合物の代表例である。このプロプラノロール含有リボソームは、「フレオン11」：エタノール、10：1 (v/v) に溶解したPCおよびプロプラノロールの溶液を水性膜溶液に注入することにより調製した。クロロフォルムオロカーボン増液（「フレオン11」と「フレオン21」とについて試験した）中に薬剤を溶解させるためには、脂質溶液中にエタノールが存在する必要がある。プロプラノロールそれ自体は水溶性であるが、脂質溶液をプロプラノロールの水溶液に注入することによりリボソームを調製する試みは成功しなかった。これは明らかに、プロプラノロールが界面活性剤として作用し、リボソーム形成中に生じる初期段階のリボソームを破壊するからである。

注入工程は、最終脂質濃度が約 $300 \mu\text{mol}/\text{ml}$ になるまで続行した。このような最終脂質濃度では、約75%の薬剤が、形成されたリボソーム中にカプセル化された。実施例VIにおけ

特許L-501228 (8)

る調製のように、非脂質成分も含まれているが、リボソームサイズは不均一であり、約10ミクロンまでのサイズが存在する。「フレオン」溶液を除去した後のリボソーム懸濁液中に残存しているエタノールは、必要に応じて透析通過、分子篩クロマトグラフィーなどにより除去し得る。しかし、懸濁液中にエタノールが存在することにより、リボソームが安定化したり、カプセル化効率が減少したりすることは明らかではない。

II. 高濃度調製

A. 経路システムおよび構成要素

高濃度法は、図1に示す約 $200 \mu\text{mol}/\text{ml}$ を超え、そして約 $500 \mu\text{mol}/\text{ml}$ までの脂質濃度と、図1の0.4ミクロン以下のリボソームサイズとを有するリボソーム懸濁液を製造するように設計されている。この方法によれば、0.45ミクロンのフィルターを通して濾過することにより容易に致密な脂質濃度のリボソーム懸濁液が直接得られる。水溶性化合物の存在下で製造した場合、リボソームは50～60%までのカプセル化効率を有する。

高濃度法を実施するのに使用するシステム10を改変したものを第2図に示す。改変されたシステムは、第2図においては一般に40で表され、第1図に示したシステム10のすべての構成要素を包含している。これらの構成要素には、第2図に示

すように、混合槽12、水浴ジャケット18、および混合ブレード32が含まれる。このシステムには、さらにリボソームを押出すための駆動（shunt）も包含される。操縦出し側には、バルブ50、ポンプ52、およびインライン押出し装置54が含まれる。例題は、好ましくは1分間あたり混合槽の全容積の少なくとも約5～10%の割合で、混合槽内の懸濁液を循環するように設計される。すなわち、例題は、少なくとも10～20分毎に、混合槽の全容積に相当する懸濁液を処理するように設計される。ポンプは、好ましくは上述した容積レベルにおいて、駆動力を約100psiにまで上昇させ得るように設計される。

このシステムに対するある実施態様では、押出し装置は、第1C図で示される形式であって、0.2～0.6ミクロンの孔サイズを有するポリカーボネートフィルターを備えた推進装置である。この方法はフィルターの最大孔サイズに近いリボソームをサイズ調整するのに効果的である。このような孔サイズは、0.2ミクロン～2ミクロンまたはそれ以上までの孔サイズから選択することができる。

別の実施態様では、押出し装置は、一連の同心状セラミック層から構成される形式の非対称セラミックフィルターである。このセラミック層は、内部の環状空間から外部の環状空間へ進むに従って、セラミックの目が密なものから粗なものに変化している。この種のフィルターは、Dortch Cel（サンジエゴ、CA）からカートリッジの形で市販されている。これらのフィルターは、0.2、0.4、または1.0ミクロンの大きさの粒

子を捕捉するのに効果的な同部孔サイズ（フィルターの目のサイズ）のものを利用することができる。リボソームのサイズ調整を効果的に行うのに、この種のフィルターを使用することは、上記の米国特許出願「リボソーム押出し法」に記載されている。この発明の重要な特徴に従って、2ミクロンのセラミックフィルターを内側から外側へ通過させるリボソームは、この膜を単に1回または数回通過させるだけで約0.4ミクロン以下の所望サイズにまで縮小されるということが見いだされた。

セラミック濾過装置は、以下のような理由により本発明において利点を有する：a）高い押出し圧力を用いることにより、処理速度を高めることができる；b）複数のフィルターカートリッジを用いることにより、かなり大きな容積をスケールアップした操作で取り扱うことができる；c）周期的に逆方向に（外側から内側へ）流量を逆転することにより、膜の目詰まりを防止することができる；そして、d）この装置はその場所が高圧または化学処理により滅菌することができる。

高濃度処理法は、第1節で述べた高カプセル化法において用いられるような溶媒中脂質および水性媒体成分を使用する。リボソームにカプセル化される水溶性の薬剤化合物を含有してもよいが、必ずしも含有する必要はない。すなわち、リボソームは親油性化合物（好ましくは脂質中脂質溶液に含有されている）、またはカプセル化された水溶性化合物のいずれか、あるいはその両方を含有するように処方され得る。

②、懸濁操作

このシステムは実質的に第1②節で述べたように操作される。混合槽における脂質濃度が所定の濃度になった時に、押し出し閥が開放され、混合槽中の物質は押出し装置を通して産物を流して凝縮する。凝縮は最初の溶媒が槽へ注入された時から操作されるが、一般に槽中の脂質濃度が50~100 g/molに達するまで押出しを開始する必要はない。この濃度以下では、荷重脂質成分で形成されている小胞は、上述したように、注入が進むにつれて次第に小さくなる。この濃度以上では、リボソームの押出しが困難になるため、高い圧力が必要となり、また押出し速度が遅くなるので効率的なサイズ調整が行えなくなる。上述したように、初期は、好ましくは約20分またはそれ以下で懸濁液の全容量を処理するような速度で操作される。より一時的には、例として、注入工程の間に水性媒体の容量を約10回超過させるような速度で操作される。

この方法の重要な特徴によれば、この方法において組み込まれたリボソームのサイズ調整段階は、高い脂質濃度で懸濁液の粘度を有意に減少させる。そして、この特徴により、サイズ調整を組み込むことなく連続し得るレベルよりも実質的に高いレベルで、懸濁液中にさらに物質を注入することが出来る。実施例Ⅳから明らかのように、脂質の注入は、最終脂質濃度が約 500 g/molに達するまで続行し得る。このような最終脂質濃度では、水溶性化合物のカプセル化効率が50%を超える。サイズ調整を同時に行わなければ、小胞懸濁液は

特表平1-501228(9)

非常に粘稠になり、高い押出し圧力を印加しても約300 g/molの脂質濃度を越えるものは押出し出すことができない。

実施例Ⅴでは、以下のような特性を有するリボソーム懸濁液を製造する方法の有開性について述べられている(a)最終脂質濃度が 500 g/mol以上、(b)リボソームサイズが約0.2ミクロンを下回る、そして(c)捕獲された水溶性物質のカプセル化効率が約55%である。実施例ⅠおよびⅡにおけるように、懸濁液は水溶性マーカーのカプセル化を測定するために、脂質濃度を増加させてモニタした。カプセル化のデータは、実施例Ⅴの表に示され、第4図にプロットされている(白丸)。明らかに押出し工程は、同等の脂質濃度では第1節で述べたシステムよりもカプセル化効率を低下させる。しかしながら、この方法は高い脂質濃度を用い得るので、50%以上のカプセル化効率が達成される。第1節で述べた調製の場合のように、大きなカプセル化効率(リボソーム透過性化合物に対して)は、第1節で述べたような脱水工程を付加することにより達成され得る。

Ⅲ、均一なサイズ調整段階

この節では、0.08ミクロンより大きく、好ましくは0.1ミクロンと、1.0ミクロンを下回る選択されたサイズ、例えば0.4ミクロンとの間のサイズ範囲内に主として存在するリボソームの懸濁液を製造するためのシステムおよび方法について述べる。この方法を、第1節および第Ⅲ節で述べた方法の

一方または両方と組合せた場合には、この懸濁液は高いカプセル化効率および/または高い脂質濃度により特徴付けられることができる。

A、処理システム

第3図には、本発明のこのような局面に従って均一なサイズのリボソームを製造するために設計されたシステム60を示す。簡単にために、このシステムは、図に無線で示した4つの機能的なサブシステムI~IVについて述べられる。これらのサブシステムは以下のことを行うために設計した：(I)懸濁液と凍結中脂質溶液との混合；(II)均様の注入および除去；(III)サイズを縮小する凍結；および(IV)最終凍結および凍結。

溶媒混合サブシステム(I)は、一対の材料供給タンク62および64を含む。これら材料供給タンクは、それぞれ溶媒中脂質物質および水性緩衝液を供給するのに使用される。両方のタンクは凍結した窒素ガスで加圧することにより、タンク中への蒸発を防止し、システム内を不活性雰囲気とする。溶媒中脂質溶液は、計量ポンプ68を用いてタンク62から混合槽66へ注入される。緩衝液は圧力下で混合槽へ供給され、その流れはバルブ70で調節される。これら2つのタンク、混合槽、および両タンクと緩衝液とを接続しているラインは、図示されているような適当なタンクジャケットおよび管状の熱交換経路により、脂質溶媒の沸点以下の温度に保たれている。

溶媒注入サブシステム(II)は、熱ジャケットで被覆された真空槽72を含む。真空槽は、熱ジャケットで被覆された静的混合槽74を経て混合槽に接続されている。この混合槽は、脂質と緩衝液とが混合槽から真空槽へ退避するにつれて、それらを混合する機能を有し、そして混合された物質を、噴霧ノズル76を適すことにより細かに霧状にして槽中に供給する。図から明らかなように、混合槽のジャケットを通して循環している加熱された液体は、混合槽中の溶媒/緩衝液混合物を、真空槽に注入する前に、該溶媒の沸点以上に暖める。真空槽は、真空源78により、選択された圧力に減圧される。

槽72はドレン76を経て高圧ポンプ78に接続されている。高圧ポンプ78は、槽中に含まれる液体を閉じたループを通して連続的に再循環する機能がある。この閉じたループには、三方の流を調節するバルブ80、導管82、および混合槽74が含まれる。明らかなように、導管82は混合槽の下流にある混合槽に物質を供給する。導管の下流末端部分は、熱ジャケットで被覆されており、混合槽への供給物質を脂質溶媒の沸点以下に冷却する。

サイズ縮小サブシステム(III)は、上述した形式のポリカーボネートフィルターやセラミックフィルターのようなフィルター84を含む。該フィルターは、選択されたサイズ範囲、好ましくは約1~2ミクロン以下にリボソームのサイズを縮小するのに効果的である。物質は、バルブ86から該フィ

特表平1-501228 (10)

ルターに供給される。バルブ80を調節することにより、真空槽からフィルターを通して凝縮の一部の過剰を調整することができる。フィルターの下流末端部はバルブ80を経て第4のサブシステムに接続されている。第4のサブシステムについては以下に述べる。

第4のサブシステムは、屋部ドレン90を備えた貯蔵タンク88から構成されている。ドレン90はポンプ92の吸入口に接続されており、該ポンプ92は貯蔵タンクに収容されている液体を造析濾過フィルター94に送って循環させる。造析濾過フィルターの孔サイズは、好ましくは約0.2ミクロンより大きなリボソームを保持するように選択される。造析濾過フィルターに保持されたもの（大きなリボソーム）は貯蔵タンクへ回収し、循環は三方バルブ96を通過させる。該三方バルブ96は、濾液（小さなリボソーム）の過剰を凝縮操作におけるドレンの方へ、あるいは造析濾過操作およびサイズ拡大操作を行うために三方の流れを開閉するバルブ70の方へ変更する。これから後者の操作を行っている間、濾液は、バルブ70を調節することにより、混合槽66に供給される。凝液をタンク64からタンク88へバルブ98を経て直接供給することができることを通じて第4のサブシステムに関する記述を完了する。

B. システムの操作

このシステムの操作は、5つの段階に分けることができる：(1)開始；(2)注入／凝縮除去；(3)サイズ縮小；(4)造析濾過／サイズ拡大；および(5)造析濾過と凝縮。

第2の凝縮注入の操作段階においては、溶媒中脂質／樹脂混合物から脂質溶媒を除去してリボソームを製造する。ここで、タンク62内の溶媒中脂質溶液は計量ポンプ68により槽62に導入され、タンク64に保持されている水性緩衝液は圧力下で混合槽に供給される。これら2つの溶液は混合槽66内で混合され、溶媒中脂質／緩衝液混合物は引続いて水性緩衝液と混合される。この水性緩衝液は、静止混合槽のすぐと前にある溶媒除去サブシステムを連通して再循環している。混合の段階において、全ての溶液は脂質溶媒の沸点以下の温度であることが重要である。混合物は静止混合槽を通過するので、その温度は脂質溶媒の（真空槽中で設定された圧力における）沸点以上の温度にまで上昇する。静止混合槽を通過した後、この混合物はノズル80により細かな霧として真空槽内に噴霧される。脂質溶媒は槽内の温度および圧力において蒸発するので、溶媒の小さな滴が槽を通過して落下するにつれて、溶媒全体が混合槽から除去される。蒸発した溶媒は、真空システムに接続されている冷却器（図示していない）により凝縮する。溶媒が除去されるにつれて、後に残る脂質は、直径が約0.1ミクロンから20ミクロンまでの間であるようなサイズの範囲にあるリボソームを形成する。溶媒の除去と組み合わせる溶媒中脂質／緩衝液混合物の注入は、水相中の脂質濃度が所望のレベルに達するまで続ける。その後、バルブ80を調節して、ポンプ78から供給された流体のある部分の流れをサイズ縮小フィルターサブシステムの方へ変更する。注入システム

システム開始段階においては、溶媒中脂質溶液は供給タンク内に保持されるが、水性緩衝液はタンク64から真空槽72へ換気空槽が約半分だけ満たされるまで通過し得る。この間は、その中の緩衝液が脂質溶媒の沸点以上になるまで熱ジャケットにより加熱される。槽の圧力は真空源71により低下させる。槽66内に収容されている加熱緩衝液は、ポンプ78により導管92と混合槽74とを通過して循環し、再び槽72に戻る。開始段階においては、バルブ80はポンプ78からのすべての流れを導管82へ送る方向に設定されるが、以下に述べるように、サイズ縮小の操作段階および造析濾過／サイズ拡大の段階においては、このバルブはループ状の流れの一部をサイズ調整フィルターを通して造析濾過のループ放循環印へ計量して流すように設定される。

加熱緩衝液は導管82を通過して循環しているので、脂質溶媒の沸点以下の導管内における熱交換により冷却される。真空槽に再び入る前に、再循環された緩衝液は静的混合槽を通過する。該静的混合槽は、ここでは2つの目的を有する：（注入／溶媒除去の段階の間に）ループを通り再循環している液体と溶媒中脂質／緩衝液混合物とを混合すること；および該混合物を脂質溶媒の沸点以上の温度に加熱することである（これは真空槽における溶媒除去を促進する）。開始段階は、真空槽および処理ライン内における流体の温度と圧力が適当な値で平衡状態に達すれば終了する。

ムを通じて流入する緩衝液と同じ容量の流れがサイズ縮小フィルターサブシステムの方向へ変更されるようにバランスをとる。

第3のサイズ縮小の操作段階においては、真空槽内への注入段階中に形成されるリボソームは、フィルター84を通すこと（押し出すこと）によりサイズ調整する。押し出した後、サイズが縮小したリボソームの懸濁液は、バルブ86を調節することにより、造析濾過システムを通過して循環している液体と混合される。

造析濾過／サイズ拡大の操作段階においては、造析濾過フィルターの孔サイズ、すなわち0.1ミクロンより小さなリボソームが濾液に入り、バルブ96およびバルブ70を通過した後、混合槽に供給される。混合槽において、いったん濾液を、タンク62から導入されている溶媒中脂質溶液にさらす。混合槽における溶媒濃度は、濾液中に存在する小さなリボソームから脂質を抽出するのに充分である。この脂質は、溶媒中脂質溶液中に導入される脂質と混合され、新しいリボソームを形成するための溶媒中脂質／緩衝液注入および溶媒除去サブシステムに注入される。この操作段階においては、造析濾過フィルターにおける放循環の存続損失を差し引くために、新しい緩衝液をタンク64から溶媒物質に導入するか、あるいは緩衝液にさらに緩衝液を加えることなく循環中にリボソーム懸濁液が濃縮されるように、このシステムを操作し得る。

最終的な造析濾過の操作段階においては、バルブ96を調整し

要約

リボソーム抽出と不純物の除去

ホスファチジルコリン (PC) はアサヒ リピッド (Asahi Lipids; 日本) より、コレステロール (CH) はシグマ ケミカル社 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) より得た。そして、ホスファチジルグリセロール (PG) はアバンティ リピッド (Avanti Lipid; Birmingham, AL) より得た。

PC (55モルパーセント)、コレステロール (35モルパーセント) およびPG (5モルパーセント) を270 度のアセトンに溶解し、最終リボソーム濃度を500 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ にした。10mM トリス-HCl, pH7.0 中の1mM カルボキシルフルオレン (CF) 溶液を、最終濃度が270 度となるように調整した。

第1図に示す、1A節で上述した懸濁システムをリボソームの調製に用いたが、オンライン排出口は用いなかった。溶液中脂質濃度 (270 度) を溶媒供給タンクに入れ、溶媒調製槽に循環させる方法により4℃に平衡化した。CFの水溶液 (270 度) を水相タンクに入れ、20℃に平衡化した。

脂質溶液を、流速2.7 ml/分水和タンクに注入した；すなわち、水和タンク中の速度調節混合機を約830 回転/分にセットし、1 ml/分/100 ml水性媒体に注入した。タンクを真空 (約200 mbar) に保ち、沸騰により除かれた溶媒を蒸留し、溶媒回収タンクに入れた。タンク中の溶媒の量はすぐに平衡に達した。溶媒注入の間定期的に、水和タンク中のリボソーム懸濁液の一定量を、(a) 脂質濃度、(b) リボソームサ

特長

イズ分布、および(c) カプセル化効率について分析するために採取した。懸濁液試料を、リボソーム懸濁液中の計算された脂質濃度が50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, および400 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ に相当する時間で採取した。すなわち、溶媒注入工程の間約12.5分毎に採取した。

試料の脂質濃度はBartlettの方法により測定した。リボソームのサイズおよびサイズ分布は電子顕微鏡写真から決定した。懸濁液を固定し、従来のように染色し、そして切片を断るためにエポキシブロックに包埋した。カプセル化効率を決定するために試料を遠心によりペレットとし、遠心分離前の溶液になるようにCFを含有しないトリス緩衝液でリボソームペレットを再懸濁した。再懸濁したリボソームは10%トリトン-X 100を母液に加えて可溶性とし、励起波長495nm および蛍光波長520 nmにおける蛍光の発生によりCF濃度を決定した。最初の水性媒体中のCF濃度は、トリトン-X 100で適当に薄めた後に同様に決定した。カプセル化のパーセントは、リボソームペレット中のCF/元の媒体中のCFの比から決定した。

以下の表1は、3つの異なる試験から得た典型的な結果を示す。第1の試験では、表に示したように、25から200 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の間の脂質濃度に相当する時間でリボソーム試料を採取した。Bartlett分析から決定した実際の脂質は中央の欄に示す。カプセル化効率は欄の右側に示す。期待される濃度に関して常に低い脂質濃度は、恐らくリボソーム自身の基本体積の置換による。表1に見られるように、約50パーセントを上回

るカプセル化効率は、約150 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 以上の脂質濃度で達成される。

試料 (脂質, μM)	実際の脂質 (脂質, μM)	カプセル化 (%CF%)
25	12.56	50.54
50	35.80	33.76
100	112.78	42.60
150	141.47	56.21
200	174.50	57.87
250	211.20	32.50
300	271.54	52.13
350	318.88	52.13
400	350.90	61.61
450	385.76	63.78
500	396.99	66.35
550	425.29	49.79
600	461.37	51.84
650	489.02	59.91
700	541.63	61.23
750	597.72	65.20

50, 100, 150, および200 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の試料濃度でのリボソームの出現形態を第1A-4図に示す。50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ では、リボソームはミクロンを下回るサイズから10ミクロンまたはそれより大きなサイズ範囲にかなり狭く分散している。100 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ では、より大きなリボソームの、約1.5 ミクロンまたはそれより大きなサイズへの変化が見られる。150 および200 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ では、懸濁液は約1.5 ミクロンよりも大きいサイズのリボソームを実質的に含有しない。

第2の試験では、脂質濃度約100-400 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 、すなわち全ての溶液中脂質濃度を水性媒体に注入することにより達

成される最も高い濃度でのカプセル化効率を調べた。最終の脂質濃度で懸濁液は、さらに脂質材料の注入を困難にするペーストのようなコンシステンシーを有した。観察されるように、脂質濃度をさらに増加させるとカプセル化効率は約66%効率にまで増大する。

第3の試験は、200-400 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ の間の脂質濃度について表1中の下方に示しており、別の試験に一致する。

(以下空白)

表 1-501228 (13)

実施例Ⅱ

懸濁液注入後のリボソームのサイズ調整

カプセル化されたCFを含むリボソームの懸濁液は、Nuclease-free Corp. (Fresno, CA) の 0.4 ミクロンのポリカーボネート膜を通して押出すことによりサイズ調整された。このリボソームは押出し圧力 200 psi で押し出された。押し出される最大の脂質濃度は $350 \mu\text{mol}/\text{ml}$ であり、そのような濃度においては、最初の押出速度は極めて遅かった。押出後の粒子径は Nicomp Laser Particle Sizer, 200 型 (Nicomp Corp., Goleta, CA) (ラタックス粒子を用いて校正) により確認された。これらの懸濁液においてはすべて、主として 0.1~0.4 ミクロンの範囲の粒子径を示した。

押出されたリボソームのカプセル化効率は、上記のようにして決定された。つまり、リボソームをペレット化し、CF を含有しない緩衝液に再懸濁させ、そして、リボソーム中の総 CF 濃度と元の未処理懸濁液中のそれとを比較することにより決定された。

その結果を下記の表 2 に示す。押出しの前と後のカプセル化効率 (それぞれ表 1 および表 2) を比較すると、次のことが示される。つまり、脂質が高濃度の場合には、最終カプセル化効率約 60% またはそれ以上が得られるにもかかわらず、最終もともからカプセル化されている CF の実質量は押出しにより失われることが示される。

試料 (脂質 μM)	元の脂質 (脂質 μM)	カプセル化 (% (CF %))
100	88.48	22.08
200	189.06	27.25
250	222.66	29.62
300	195.24	26.06
100	52.88	0.25
200	110.16	18.50
250	145.63	29.96
300	168.27	28.65
350	205.28	44.93

実施例Ⅲ

カルシトニンをカプセル化したリボソーム

部分加水分解ダイズホスファチジルコリン (PHSPC) は Avrami Lecithin (Atlanta, GA) から、そしてコレステロール (CH) および α -トコフェロール (α -T) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から入手した。

PHSPC (67 モル%), コレステロール (33 モル%) および α -T (0.1 モル%) を "アレオン 11" 50 ml に溶解させ、脂質の最終濃度を約 $300 \mu\text{mol}/\text{ml}$ とした。この系の水性媒体は、 10^3 倍濃化カルシトニン ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$) の酢酸緩衝液 ($4 \text{ g}/\text{l}$ 酢酸ナトリウム), pH 4.2, の溶液 50 ml であった。

溶液注入工程は、実施例 I に記載したのと全く同様に、脂質溶液を水和タンク中に約 $0.5 \text{ ml}/\text{分}$ (例えば、 $1 \text{ ml}/\text{分}$ / 水性媒体 100 ml) の流速で注入することにより行われた。この処理の最後における懸濁液中のリボソーム濃度は $258 \mu\text{mol}/\text{ml}$ であった。最終的に得られる懸濁液の一部を、製剤を含有

しない緩衝液で 1:10, 1:20, または 1:40 に希釈し、ホルテックスにかけ、リボソームの均一な分散液を得た。放射能物質の総回収率 (下記の表 3 で 2 種の調製物について示される) により、上記 3 種の希釈割合の各々において、カルシトニン物質が実質的に 100% 回収されることが示される。

希釈された試料を高速度遠心分離してリボソームをペレット化し、そして、該ペレット中の放射能活性を測定し、試料中に含有される総放射活性と比較した。2 つの値の比をカルシトニンのカプセル化の割合 (%) を算出するのに用いた。その結果を 2 種の調製物のそれぞれについて表 3 に示す。表 3 から、各調製物において測定したカプセル化の平均値 (%) は約 90% を超えることがわかる。

表 3

調製物 1 回収率 (%)	1:10 102.22	1:20 97.60	1:40 95.09
カプセル化 (%)	58.75	94.28	60.48
調製物 2 回収率 (%)	97.75	103.46	92.19
カプセル化 (%)	61.66	99.28	63.12

調製物のリボソームのサイズ分布は非常に異なって分散した状態であり、サイズの範囲は約 0.1 から 10.0 ミクロンを示す。この結果により、荷電脂質成分が存在しない方法において懸濁され得るリボソームのサイズ不均質性の程度が示される。これとは逆に、実施例 I のように荷電脂質成分が使用された場合には、最大リボソームサイズ約 1.5 ミクロンが観察

され得る。

実施例Ⅳ

カプセル化プロブアラノールのリボソーム

PC (実施例 I) および PB-プロブアラノール (1-イソプロピルアミノ)-3- α -(1-ナフチルオキシ)-2-プロブアラノール) を、アレオン 11/エタノール 10:1 (v/v) 50 ml 中に、最終脂質濃度が約 $300 \mu\text{mol}/\text{ml}$ 、そして最終プロブアラノール濃度が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解させた。この系における水性媒体は、10 mM トリス HCl, pH 7.0, 50 ml であった。

溶液注入工程は、実施例 I に記載したのと全く同様に、脂質溶液を水和タンク中に約 $0.5 \text{ ml}/\text{分}$ (例えば、 $1 \text{ ml}/\text{分}$ / 水性媒体 100 ml) の流速で注入することにより行われた。この処理の最後における懸濁液中のリボソーム濃度は $288 \mu\text{mol}/\text{ml}$ であった。最終的に得られる懸濁液の一部を、緩衝液で 1:5 に希釈し、ホルテックスにかけ、リボソームの均一な分散液を得た。希釈された試料を高速で遠心分離してリボソームをペレット化し、そして、ペレット中の放射能活性を測定し、試料中に含有される総放射活性と比較した。材料全体に対するカプセル化物の比率は約 75% であった。

実施例Ⅴ

溶液注入/リボソーム押出しの組合せ

実施例 I に準じ、次の (I) および (II) の改善を行ない、リボソーム懸濁液を調製した。(I) 溶液 中 脂 質 濃 度 は $500 \mu\text{mol}/\text{ml}$ を含有した。および (II) 水和タンク中の水性リボソーム懸濁液を

特表平1-501228(14)

第1図に示すシステムのフィルター抽出ラインを通して循環させた。このラインは、高圧ポンプ、および閉鎖された膜チャンパー（ここには、0.4ミクロンのポリカーボネートフィルターがとりつけられている）を有する。濾過槽の上流側の圧力を約 1psiに保ち、操作の最初の段階において流速が約 100分/分となるようにした。

サイズ調整を同時に行わない溶媒注入方法とは異なり、最も高い脂質濃度（約500 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ）でさえもリボソーム懸濁液は充分に液体であるため、さらに引き続いて注入を行うことが可能である。この方法によればまた、押出しが行われた後に溶媒注入により、リボソーム凝集が行われる場合には、より高濃度（例えば、500 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 対350 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ）の脂質懸濁液の押出しが可能である。

様々な濃度におけるリボソーム物質のカプセル化効率を表4に示す。このデータにより、約0.4ミクロンを下まわるサイズ、および約50%を超えるカプセル化効率、を要する高濃度の調製物がこの方法により直接調製されることが示される。

表 4

試料 (脂質 μmol)	Cell PL (脂質 μmol)	カプセル化 ($\text{CF}\%$)
100	57.92	17.62
200	101.42	18.08
250	156.52	20.26
300	171.80	24.61
350	210.06	31.72
400	332.82	49.82
500	559.58	55.94

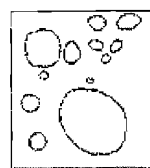
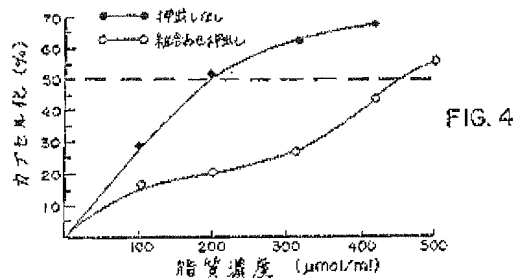
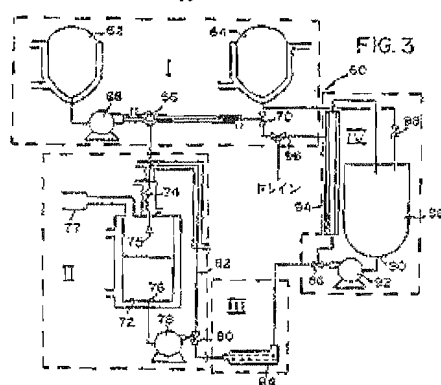
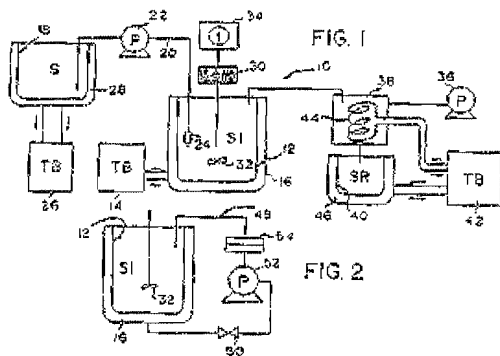


FIG. 5A

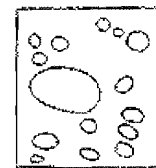


FIG. 5B

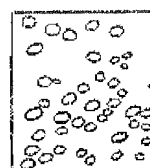


FIG. 5C

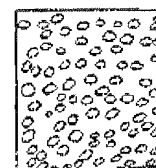


FIG. 5D

